



日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1993年 6月16日

願 番 号  
Application Number:

平成 5年特許願第145134号

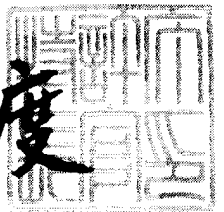
願 人  
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

1993年 9月24日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

麻 生 渡



出証番号 出証特平05-3008934

【書類名】 特許願

【整理番号】 A93159

【提出日】 平成 5年 6月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 9/52  
A61K 37/02

【発明の名称】 生理活性ペプチドの徐放性製剤

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市すみれが丘1丁目7番1-509号

【氏名】 亀井 茂

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区本山南町5丁目4番25-503号

【氏名】 猪狩 康孝

【発明者】

【住所又は居所】 京都府乙訓郡大山崎町字大山崎小字谷田77番地の42

【氏名】 小川 泰亮

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 森田 桂

【代理人】

【識別番号】 100089543

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩田 弘

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 4年特許願第327070号

【出願日】 平成 4年12月 7日

【整理番号】 A92369

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 14,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000050

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】生理活性ペプチドの徐放性製剤

【特許請求の範囲】

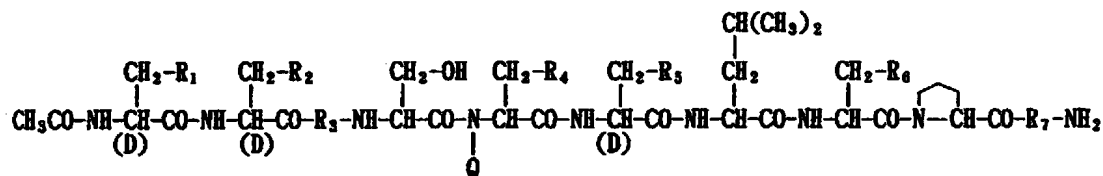
【請求項1】 (A) グリコール酸と一般式

【化1】



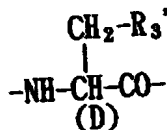
(式中、Rは炭素数2から8のアルキル基を表す) で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体および (B) ポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーと一般式

【化2】



〔式中、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>は芳香環基を、R<sub>3</sub>はD-アミノ酸残基または式

【化3】



(式中、R<sub>3</sub>'は複素環基を示す) で表される基を、R<sub>5</sub>は式  $-(\text{CH}_2)_n\text{-R}_5'$  (式中、n=2または3を、R<sub>5</sub>'は置換されていてもよいアミノ基を示す) で表される基、芳香環基またはO-グリコシル基を、R<sub>6</sub>は式  $-(\text{CH}_2)_n\text{-R}_6'$  (式中、n=2または3を、R<sub>6</sub>'は置換されていてもよいアミノ基を示す) で表される基を、R<sub>7</sub>はD-アミノ酸残基またはアザグリシル残基を、Qは水素原子または低級アルキル基を示す) で表される生理活性ペプチドまたはその塩からなる徐放性製剤。

【請求項2】 (A) グリコール酸と一般式

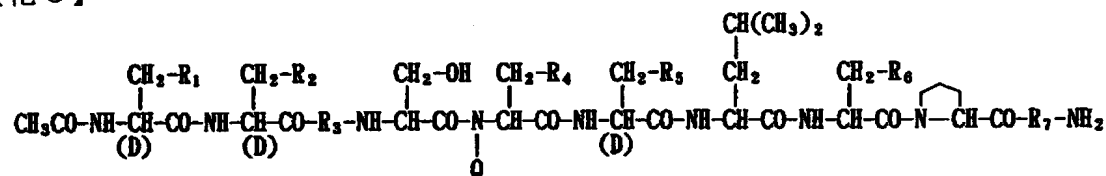
【化4】



(式中、Rは炭素数2から8のアルキル基を表す)で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体および(B)ポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーと水に難溶性の生理活性ペプチドまたはその塩とを、水と実質的に混和しない溶媒にいったん溶解し、ついで溶媒を除去することを特徴とする徐放性製剤の製造法。

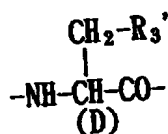
【請求項3】 水に難溶性の生理活性ペプチドが一般式

【化5】



〔式中、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>は芳香環基を、R<sub>3</sub>はD-アミノ酸残基または式

【化6】



(式中、R<sub>3</sub>'は複素環基を示す)で表される基を、R<sub>5</sub>は式-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>5</sub>'(式中、n=2または3を、R<sub>5</sub>'は置換されていてもよいアミノ基を示す)で表される基、芳香環基またはO-グリコシル基を、R<sub>6</sub>は式-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>6</sub>'(式中、n=2または3を、R<sub>6</sub>'は置換されていてもよいアミノ基を示す)で表される基を、R<sub>7</sub>はD-アミノ酸残基またはアザグリシル残基を、Qは水素原子または低級アルキル基を示す)で表されるペプチドである請求項2記載の徐放性製剤の製造法。

【請求項4】 生体内分解性ポリマーと水に難溶性の生理活性ペプチドまたはその塩とを、水と実質的に混和しない溶媒に溶解し、得られる溶液を水相中に加え○

／Wエマルジョンを形成させる請求項2記載の徐放性製剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、水に難溶性の生理活性ペプチドを含有する徐放性医薬製剤およびその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来の技術として、例えば、EP-A-481,732 には、薬物とポリ乳酸およびグリコール酸／ヒドロキシカルボン酸〔 $\text{HOCH}(\text{C}_{2-8}\text{アルキル})\text{COOH}$ 〕共重合体からなる徐放性製剤が記載されている。該製剤の製法として、生理活性ペプチドの水溶液を内水相とし、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液を油相とする W/O 型乳化物を水等に加え、W/O/W 型乳化物から徐放性マイクロカプセルを製造する方法（水中乾燥法）等が記載されている。

特開昭57-118512号公報には、ホルモン作用を有するポリペプチド、生物的に分解可能な重合体および重合体水解性調製剤からなるマイクロカプセルが記載されている。その製造法としては、ポリペプチドの水溶液を内水相とし、ハロゲン化有機溶剤溶液を油相とする W/O 型乳化物にコアセルベーション剤を加えてマイクロカプセルを製造する、いわゆるコアセルベーション法が記載されている。

特開平1-121222号公報には、ポリラクチド、乳酸とグリコール酸とのコポリマー、このようなポリマーの混合物および水不溶性のペプチドからなる薬剤組成物の記載がある。また、ポリラクチド、ポリグリコリド、乳酸とグリコール酸とのコポリマー、もしくはそのようなポリマーの混合物の溶液中に水不溶性のペプチド塩を分散させ、溶媒を乾燥除去し、生じた混合物を固体粒子に成形する方法が記載されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

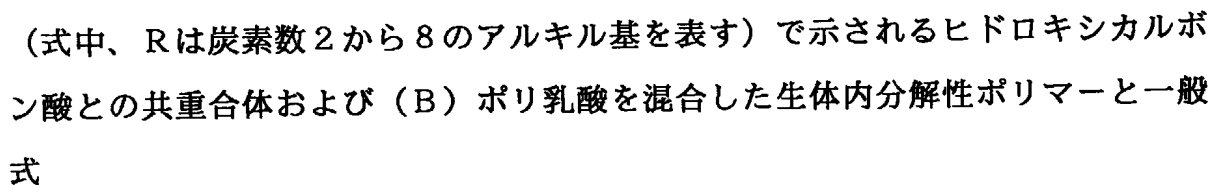
徐放性製剤として薬物を生体に投与する場合、生体本来の機能との相互作用に

特に長期間（例えば 1 ～ 3 カ月）型徐放性製剤においては、安全でより確実な効果を得るために、より確実性の高い定常的な薬物の放出が重要な課題である。また、同時に薬物の放出を容易に制御でき、投与直後における過剰量の薬物放出（初期バースト）を抑制し得る徐放性製剤が求められている。

【課題を解決するための手段】

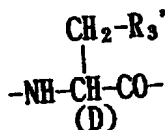
すなわち、本発明は、

【化 7】


$$\begin{array}{ccccccccccccccccccc} & & \text{CH}_2\text{-R}_1 & & \text{CH}_2\text{-R}_2 & & \text{CH}_2\text{-OH} & \text{CH}_2\text{-R}_4 & \text{CH}_2\text{-R}_5 & & \text{CH(CH}_3)_2 & & \text{CH}_2\text{-R}_6 & & & & & \\ & & | & & | & & | & | & | & & | & & | & & \text{CH}_2 & & \text{CH}_2\text{-R}_6 & & \\ \text{CH}_3\text{CO-NH} & \text{CH} & \text{CO-NH} & \text{CH} & \text{CO-R}_3 & \text{NH} & \text{CH} & \text{CO-N} & \text{CH} & \text{CO-NH} & \text{CH} & \text{CO-NH} & \text{CH} & \text{CO-NH} & \text{CH} & \text{CO-N} & \text{CH} & \text{CO-R}_7 & \text{NH}_2 \quad (\text{II}) \\ & & (\text{D}) & & (\text{D}) & & & & & & (\text{D}) & & & & & & & & \end{array}$$

4

【化9】



(式中、 $\text{R}_3'$ は複素環基を示す)で表される基を、 $\text{R}_5$ は式 $-(\text{CH}_2)_n\text{-R}_5'$ (式中、 $n=2$ または $3$ を、 $\text{R}_5'$ は置換されていてもよいアミノ基を示す)で表される基、芳香環基またはO-グリコシル基を、 $\text{R}_6$ は式 $-(\text{CH}_2)_n\text{-R}_6'$ (式中、 $n=2$ または $3$ を、 $\text{R}_6'$ は置換されていてもよいアミノ基を示す)で表される基を、 $\text{R}_7$ はD-アミノ酸残基またはアザグリシル残基を、Qは水素原子または低級アルキル基を示す)で表される生理活性ペプチドまたはその塩からなる徐放性製剤、および

(2) (A) グリコール酸と一般式

【化10】



(式中の記号は前記と同意義を表す)で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体および(B)ポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーと水に難溶性の生理活性ペプチドとを、水と実質的に混和しない溶媒にいったん溶解し、ついで溶媒を除去することを特徴とする徐放性製剤の製造法に関する。

【0005】

一般式[I]中、Rで示される炭素数2から8の直鎖または分枝状のアルキル基としては、例えばエチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、2-エチルブチルなどが挙げられる。好ましくは、炭素数2から5の直鎖または分枝状のアルキル基が用いられる。具体例としては、例えばエチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなどが挙げら



れる。特に好ましくは、Rはエチルである。

一般式〔I〕で示されるヒドロキシカルボン酸としては、例えば2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸、2-ヒドロキシイソカプロン酸、2-ヒドロキシカプリン酸などが挙げられる。このうち特に、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸が好ましい。一般式〔I〕で示されるヒドロキシカルボン酸は、特に好ましくは2-ヒドロキシ酪酸である。これらのヒドロキシカルボン酸はD-体、L-体およびD,L-体の何れでもよいが、D-体/L-体（モル%）が約75/25～約25/75の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、D-体/L-体（モル%）が約60/40～約40/60の範囲のヒドロキシカルボン酸である。特に好ましくは、D-体/L-体（モル%）が約55/45～約45/55の範囲のヒドロキシカルボン酸である。

#### 【0006】

グリコール酸と一般式〔I〕で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体（以下、グリコール酸共重合体と略称する）において、共重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトの何れでもよい。好ましくは、ランダム共重合体である。

一般式〔I〕で示されるヒドロキシカルボン酸は、1種または2種以上適宜の割合で用いてもよい。

上記（A）のグリコール酸共重合体におけるグリコール酸と一般式〔I〕で示されるヒドロキシカルボン酸との組成比は、グリコール酸が約10～約75モル%、残りがヒドロキシカルボン酸である場合が好ましい。さらに好ましくは、グリコール酸が約20～約75モル%、残りがヒドロキシカルボン酸である場合である。特に好ましくは、グリコール酸が約40～約70モル%、残りがヒドロキシカルボン酸である場合である。これらグリコール酸共重合体は、重量平均分子量が約2000～50000のものが用いられる。好ましくは、重量平均分子量が約3000～40000の共重合体である。さらに好ましくは、重量平均分子量が約8000～30000の共重合体である。また、これらのグリコール酸共重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は約1.2から4.0が好ましい。特に好ましくは、分散度が約1.5から3.5の共重合体である。

上記（Ａ）のグリコール酸共重合体は、公知の製造法、例えば、特開昭61-28521号公報に記載の方法に従って合成できる。

#### 【0007】

ポリ乳酸としては、L-体、D-体およびこれらの混合物の何れでもよいが、D-体／L-体（モル％）が約75/25～約20/80の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、D-体／L-体（モル％）が約60/40～約25/75の範囲のポリ乳酸である。特に好ましくは、D-体／L-体（モル％）が約55/45～約25/75の範囲のポリ乳酸である。該ポリ乳酸は、重量平均分子量が約1500～30000の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、重量平均分子量が約2000～20000の範囲のポリ乳酸である。特に好ましくは、重量平均分子量が約3000～15000の範囲のポリ乳酸である。また、ポリ乳酸の分散度は約1.2から4.0が好ましい。特に好ましくは、分散度が約1.5から3.5の場合である。

ポリ乳酸の合成法については、乳酸の二量体であるラクチッドを開環重合する方法と乳酸を脱水重縮合する方法が知られている。本発明で使用する比較的低分子量のポリ乳酸を得るためには、乳酸を直接脱水重縮合する方法が好ましい。該方法は、例えば特開昭61-28521号公報に記載されている。

#### 【0008】

本発明において、重量平均分子量および分散度とは、重量平均分子量が 120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2,950、1,050、580、162 の 9 種類のポリスチレンを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）で測定したポリスチレン換算の分子量および算出した分散度を示す。測定は、GPCカラムKF804L × 2（昭和電工製）、RI モニター L-3300（日立製作所 製）を使用、移動相としてクロロホルムを用いた。

#### 【0009】

本発明の製剤基剤におけるグリコール酸共重合体（Ａ）とポリ乳酸（Ｂ）は、例えば（Ａ）／（Ｂ）で表わされる混合比（重量％）が約10/90～約90/10の範囲で使用される。好ましくは、混合比（重量％）が約20/80～80/20の範囲である。さらに好ましくは、約30/70～70/30の範囲である。（Ａ）、（Ｂ）のうち何れかの成分が多すぎると（Ａ）もしくは（Ｂ）成分を単独で使

同じ薬物放出パターンを有する製剤しか得られず、混合基剤による放出後期の直線的な放出パターンが期待できない。グリコール酸共重合体およびポリ乳酸の分解・消失速度は分子量あるいは組成によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸共重合体の分解・消失速度の方が速いため、混合するポリ乳酸の分子量を大きくする、あるいは(A)/(B)で表わされる混合比を小さくすることによって放出期間を長くすることができる。逆に、混合するポリ乳酸の分子量を小さくする、あるいは(A)/(B)で表わされる混合比を大きくすることによって放出期間を短くすることもできる。さらに、一般式〔I〕で示されるヒドロキシカルボン酸の種類や割合を変化させることにより、放出期間を調節することもできる。

#### 【0010】

一般式〔II〕中、 $R_1$ 、 $R_2$ または $R_4$ で示される芳香環基としては、例えば炭素数6～12の芳香環基が挙げられる。このような芳香環基としては、例えばフェニル、ナフチル、アントリルなどが挙げられる。好ましくは、炭素数6～10の芳香環基、例えばフェニル、ナフチルなどが挙げられる。これらの芳香環基は、芳香環基上の適当な位置に1ないし5個、好ましくは、1ないし3個の適当な置換基を有していてもよい。該置換基としては、例えば水酸基、ハロゲン、アミノトリアゾリルで置換されたアミノ基、アルコキシ基などが挙げられる。好ましくは、例えば水酸基、ハロゲン、アミノトリアゾリルで置換されたアミノ基などが挙げられる。

ここにおいて、ハロゲンとしては、例えばフッ素、塩素、臭素、ヨウ素等が挙げられる。

アミノトリアゾリルで置換されたアミノ基におけるアミノトリアゾリル基としては、例えば3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール-5-イル、5-アミノ-1H-1,3,4-トリアゾール-2-イル、5-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール-3-イル、3-アミノ-2H-1,2,4-トリアゾール-5-イル、4-アミノ-1H-1,2,3-トリアゾール-5-イル、4-アミノ-2H-1,2,3-トリアゾール-5-イルなどが挙げられる。

アルコキシ基としては、好ましくは炭素数1～6のアルコキシ基（例、メトキ

シ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシなど)が挙げられる。

上記のうち特に好ましくは、 $R_1$ は、ナフチル基またはハロゲノフェニル基である。特に好ましくは、 $R_2$ は、ハロゲノフェニルである。特に好ましくは、 $R_4$ は、ヒドロキシフェニル基またはアミノトリアゾリルアミノで置換されたフェニル基である。

#### 【0011】

$R_3$ で示されるD-アミノ酸残基としては、炭素数3～12の $\alpha$ -D-アミノ酸残基が好ましい。該アミノ酸としては、例えばロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、2-アミノ酪酸、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、メチオニン、アラニン、トリプトファン、アミノイソ酪酸などが挙げられる。これらは適宜保護基(例、*t*-ブチル、*t*-ブトキシ、*t*-ブトキシカルボニルなどの当技術分野で慣用の保護基)を有していてもよい。

#### 【0012】

$R_3'$ で示される複素環基としては、窒素原子または硫黄原子のヘテロ原子を1～2個を含み、ベンゼン環と縮合していてもよい5または6員の複素環基が挙げられる。具体例としては、例えばチエニル、ピロリル、チアゾリル、イソチアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、3-ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、3-ベンゾ[b]チエニル、3-ベンゾ[b]-3-チエニル、インドリル、2-インドリル、イソインドリル、1H-インダゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、キノリル、イソキノリルなどが挙げられる。特に好ましくは、 $R_3'$ は、ピリジルまたは3-ベンゾ[b]チエニルである。

#### 【0013】

$R_5$ で示される芳香環基としては、上記 $R_1$ 、 $R_2$ または $R_4$ で定義した芳香環基と同様のものが用いられる。該芳香環基は、芳香環基上の適当な位置に1ないし5個、好ましくは、1ないし3個の適当な置換基を有していてもよい。このような置換基としては、上記 $R_1$ 、 $R_2$ または $R_4$ で定義した置換基と同様のものが用いられる。このうち特に好ましくは、アミノトリアゾリルで置換されたアミノ基である。

$R_5$ で示されるO-グリコシル基におけるグリコシル基としては、好ましくは、6単糖類およびその誘導体の基が挙げられる。該6単糖類としては、例えばD-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、D-ガラクトース、L-ガラクトースなどが挙げられる。また、誘導体としては、例えばデオキシ糖（L-およびD-フコース、D-キノボース、L-ラムノースなど）、アミノ糖（D-グルコサミン、D-ガラクトサミンなど）が挙げられる。さらに好ましくは、デオキシ糖（L-およびD-フコース、D-キノボース、L-ラムノースなど）である。特に好ましくはL-ラムノースである。

## 【0014】

$R_5'$ で示される置換されていてもよいアミノ基における置換基としては、例えばアシル基、カルバモイル基、アシル基で置換されていてもよいカルバゾイル基またはモノもしくはジアルキルで置換されていてもよいアミジノ基などが挙げられる。

上記アシル基およびアシル基で置換されていてもよいカルバゾイル基におけるアシル基としては、例えばニコチノイル、フロイル、テノイルなどが挙げられる。

モノもしくはジアルキルアミジノ基におけるアルキル基としては、炭素数1から4の直鎖または分枝状のアルキル基が用いられる。該アルキル基としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなどが挙げられる。好ましくは炭素数1から3の直鎖または分枝状のアルキル基が挙げられる。特に好ましくはメチル基またはエチル基が挙げられる。

## 【0015】

$R_6'$ で示される置換されたアミノ基における置換基としては、例えばアルキル基またはモノもしくはジアルキルで置換されていてもよいアミジノ基などが挙げられる。

上記アルキル基およびモノもしくはジアルキルアミジノ基におけるアルキル基としては、上記 $R_5'$ で定義したアルキル基と同様のものが用いられる。

$R_7$ で示されるD-アミノ酸残基としては、炭素数3～9のD-アミノ酸残基が

好ましく、例えばD-アラニン残基、D-ロイシン残基、D-バリン残基、D-イソロイシン残基、D-フェニルアラニン残基などが挙げられる。さらに好ましくは炭素数3～6のD-アミノ酸残基、例えばD-アラニン残基、D-バリン残基などが挙げられる。

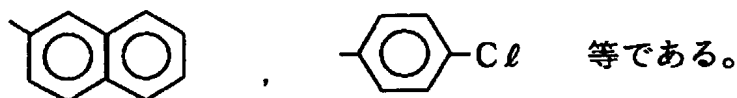
特に好ましくは、 $R_7$ は、D-アラニン残基である。

Qで示される低級アルキル基としては、上記 $R_5'$ で定義したアルキル基と同様のものが用いられる。特に好ましくは、Qは、メチル基である。

【0016】

$R_1$ の具体例を挙げれば、

【化11】



$R_2$ の具体例を挙げれば、

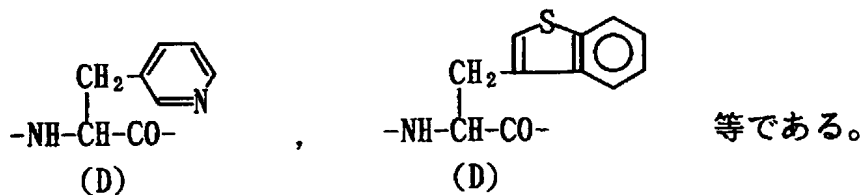
【化12】



【0017】

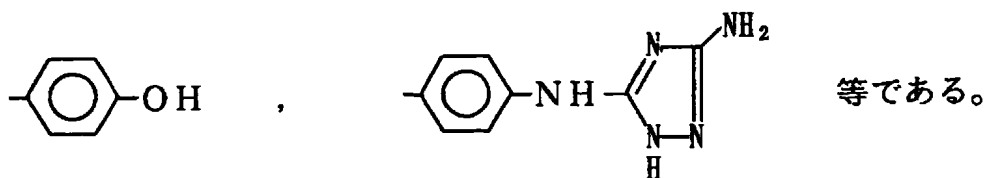
$R_3$ の具体例を挙げれば、

【化13】



$R_4$ の具体例を挙げれば、

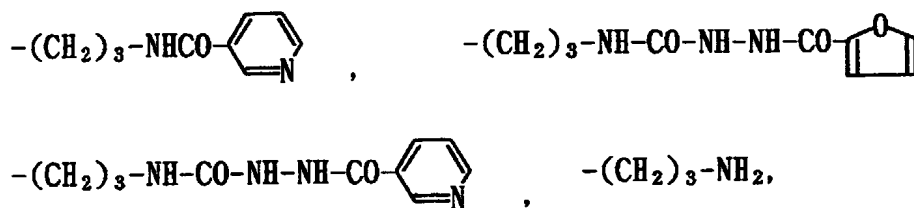
【化14】



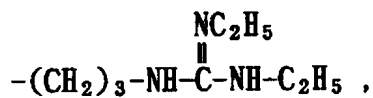
【0018】

R<sub>5</sub>の具体例を挙げれば、

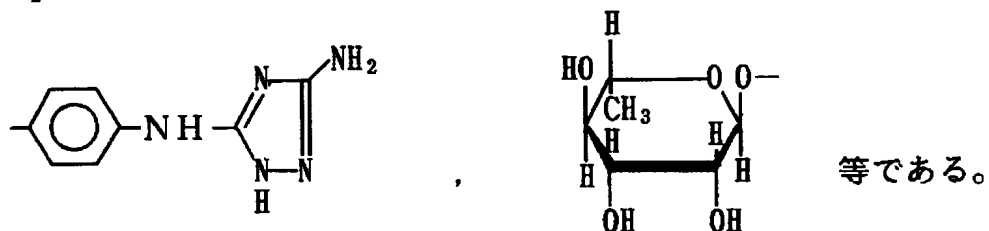
【化15】



【化16】



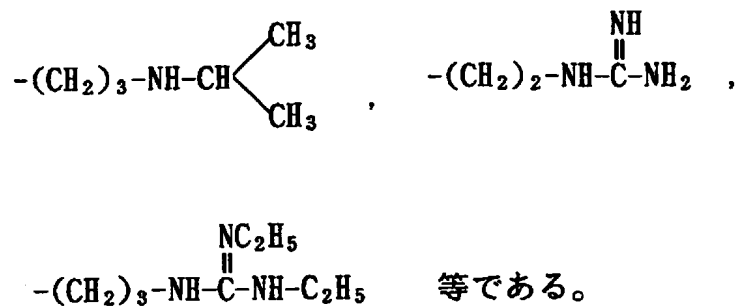
【化17】



【0019】

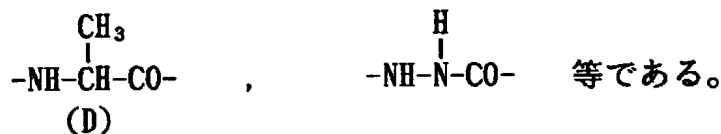
R<sub>6</sub>の具体例を挙げれば、

【化18】



R<sub>7</sub>の具体例を挙げれば、

【化19】



本発明において、アミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

一般式〔II〕で表される生理活性ペプチドまたはその塩は、自体公知の方法により製造できる。生理活性ペプチドの製造法の具体例は、例えば米国特許第5110904号などに記載されている。

【0020】

本発明の徐放性製剤は、グリコール酸共重合体およびポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーと水に難溶性の生理活性ペプチドまたはその塩とを、水と実質的に混和しない溶媒にいったん溶解し、ついで溶媒を除去することにより製造することができる。

本発明の製造法において、水に難溶性の生理活性ペプチドとしては天然物、合成物、半合成物を含めて特に限定されないが、例えば、側鎖に芳香属性基（例、ベンゼン、ナフタレン、フェナントレン、アントラセン、ピリジン、ピロール、インドール等から誘導される基）を1個以上有する生理活性ペプチドが好ましい。さらに好ましくは、側鎖に芳香属性基を2個以上有する生理活性ペプチドであ



る。特に好ましくは、側鎖に芳香属性基を3個以上有する生理活性ペプチドである。なお、これらの芳香族基は置換基を有していてもよい。

本発明で用いられる水に難溶性の生理活性ペプチドは、水に対する溶解度が1%以下で、かつ2個以上のペプチドによって構成され、分子量約200~30000のものが好ましい。さらに好ましくは、分子量が約300~20000のペプチドである。特に好ましくは、分子量約500~10000のペプチドである。

#### 【0021】

該生理活性ペプチドとしては、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH)拮抗物質 (米国特許第4,086,219号、同第4,124,577号、同第4,253,997号、同第4,317,815号等参照)、インスリン、ソマトスタチン、ソマトスタチン誘導体 (米国特許第4,087,390号、同第4,093,574号、同第4,100,117号、同第4,253,998号参照)、成長ホルモン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、メラノサイト刺激ホルモン (MSH)、甲状腺ホルモン放出ホルモンの塩およびその誘導体 (特開昭50-121273号、特開昭52-116465号公報参照)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、バソプレシン、バソプレシン誘導体、オキシトシン、カルシトニン、ガストリン、セクレチン、パンクレオザイミン、コレシストキニン、アンジオテンシン、ヒト胎盤ラクトーゲン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG)、エンケファリン、エンケファリン誘導体 (米国特許第4,277,394号、ヨーロッパ特許出願公開第31567号公報参照)、エンドルフィン、キョウトルフィン、タフトシン、サイモポイエチン、サイモシン、サイモスチムリン、胸腺液性因子 (THF)、血中胸腺因子 (FTS) およびその誘導体 (米国特許第4,229,438号参照)、およびその他の胸腺因子、腫瘍壊死因子 (TNF)、コロニー誘発因子 (CSF)、モチリン、ディノルフィン、ボムベシン、ニューロテンシン、セルレイン、ブラジキニン、心房性ナトリウム排泄増加因子、神経成長因子、細胞増殖因子、神経栄養因子、エンドセリン拮抗作用を有するペプチド類 (ヨーロッパ特許公開第436189号、同第457195号、同496452号、特開平3-94692号、同3-130299号公報参照) など、さらにはこれらの生理活性ペプチドのフラグメントまたはそれらの誘導体などが挙げられる。

## 【0022】

該生理活性ペプチドの具体例としては、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) の拮抗薬であって、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、思春期早発症、乳癌等のホルモン依存性の疾病および避妊に有効な生理活性ペプチドおよびその塩が挙げられる。

本発明で用いられる生理活性ペプチドは塩として用いてもよく、好ましくは、薬理的に許容される塩が用いられる。このような塩としては、該ペプチドがアミノ基などの塩基性基を有する場合、無機酸 (例、塩酸、硫酸、硝酸など)、有機酸 (例、炭酸、重炭酸塩、コハク酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸など) などとの塩が挙げられる。ペプチドがカルボキシル基等の酸性基を有する場合、無機塩基 (例、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属など) や有機塩基 (例、トリエチルアミン等の有機アミン類、アルギニン等の塩基性アミノ酸類など) などとの塩が挙げられる。また、該ペプチドは、金属錯体化合物 (例、銅錯体、亜鉛錯体等) を形成していてもよい。

生理活性ペプチドまたはその塩の具体例は、例えば米国特許第5110904号、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry) 第34巻 2395 ~ 2402 頁 (1991年)、リーセント・リザルツ・イン・キャンサー・リサーチ (Recent Results in Cancer Research) 第124巻 113 ~ 136 頁 (1992年) などに記載されている。

## 【0023】

さらに具体的には、例えば一般式〔II〕で示される生理活性ペプチドおよびその塩が挙げられる。

また、生理活性ペプチド自体が水溶性であっても、誘導体または水不溶性の酸 (パモイン酸、タンニン酸、ステアリン酸、パルミチン酸など) との塩とすることにより水に難溶性のペプチドとし、本発明の製造法に用いることができる。

上記生理活性ペプチドの配合量は、ペプチドの種類、所望の薬理効果および効果の持続期間などによって異なるが、基剤の生体内分解性ポリマーに対して約 0.001% ~ 約 50% (w/w) 用いられる。好ましくは、約 0.01% ~ 40% (w/w) 用

いられる。特に好ましくは、約 0.1% ~ 30% (w/w)用いられる。

#### 【0024】

水と実質的に混和しない溶媒は、水と実質的に混和せず、生体内分解性ポリマーを溶解し、得られるポリマー溶液がさらに生理活性ペプチドを溶解するものであればよい。好ましくは、水に対する溶解度が常温（20℃）で 3%以下である溶媒である。該溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素など）、エーテル類（例、エチルエーテル、イソプロピルエーテルなど）、脂肪酸エステル（例、酢酸エチル、酢酸ブチルなど）、芳香族炭化水素（例、ベンゼン、トルエン、キシレンなど）等が挙げられる。これらは2種以上適宜の割合で混合して用いてもよい。

溶媒を除去する方法は、自体公知の方法に従って行うことができる。例えばプロペラ型攪拌機あるいはマグネチックスターラーなどで攪拌しながら常圧もしくは徐々に減圧にして溶媒を蒸発させる方法、ロータリーエバポレーターなどを用いて真空度を調節しながら溶媒を蒸発させる方法などが挙げられる。

#### 【0025】

本発明の徐放性製剤は、例えば以下のような水中乾燥法あるいは相分離法によってマイクロカプセル化する方法またはこれに準ずる方法によって製造される。

生理活性ペプチドを上記の生理活性ペプチドの配合量の定義で示した重量比率になるように生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に加え、ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液を作る。この際、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中の濃度は生体内分解性ポリマーの分子量、有機溶媒の種類によって異なるが、一般的には約0.01~約80% (w/w)から選ばれる。さらに好ましくは約0.1~約70% (w/w)である。特に好ましくは約1~約60% (w/w)である。

#### 【0026】

次いで、この生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液（油相）を第2相目の水相中に加え、O（油相）/W（水相）エマルションを形成させた後、油相中の溶媒を蒸発させ、マイクロカプセルを調製する。この際の水相体積は一般的には油相体積の約1倍~約10000倍から選ばれる。さらに好ましくは、

約2倍～約5000倍から選ばれる。特に好ましくは、約5倍～約2000倍から選ばれる。

上記外水相中に乳化剤を加えてもよい。該乳化剤は、一般に安定な O/W エマルションを形成できるものであればいずれでもよい。具体的には、例えばアニオン性界面活性剤（オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなど）、非イオン性界面活性剤（ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル〔ツイーン (Tween) 80, ツイーン (Tween) 60, アトラスパウダー社〕, ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体〔HCO-60, HCO-50, 日光ケミカルズ〕など）、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸などが挙げられる。これらの中の1種類か、いくつかを組み合わせ使用してもよい。使用の際の濃度は、約 0.001 % から 20% (w/w) の範囲から適宜選択できる。さらに好ましくは約 0.01% から 10% (w/w) の範囲で用いられる。特に好ましくは約 0.05% から 5% (w/w) の範囲で用いられる。

#### 【0027】

このようにして得られたマイクロカプセルは遠心分離あるいは濾過して分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している遊離のペプチド、薬物保持物質、乳化剤などを蒸留水で数回繰り返し洗浄し、再び蒸留水などに分散して凍結乾燥する。その後、必要であれば、減圧下加温してマイクロカプセル中の水分および有機溶媒の除去をさらに行う。好ましくは、毎分10～20℃の昇温速度の条件下で示差走査熱量計で求めた生体内分解性ポリマーの中間点ガラス転移温度よりも5℃以上高い温度で、一般的にはマイクロカプセル自体が所定の温度に達した後2週間以内、1週間あるいは2～3日、より好ましくは24時間以内行う。

#### 【0028】

相分離法によりマイクロカプセルを製造する場合は、上記の生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液にコアセルベーション剤を攪拌下徐々に加え、生体内分解性ポリマーを析出、固化させる。該コアセルベーション剤は、生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液の体積の約0.01倍～約1000倍の体積量に加えられる。さらに好ましくは、約0.05倍～約500倍の体

積量である。特に好ましくは、約0.1倍～約200倍の体積量である。

コアセルベーション剤としては、生体内分解性ポリマーの溶媒に混和する高分子系、鉱物油系または植物油系の化合物で、ポリマーを溶解しないものであればよい。具体的には、例えばシリコン油、ゴマ油、大豆油、コーン油、綿実油、ココナツ油、アマニ油、鉱物油、*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタンなどが挙げられる。これらは2種以上混合して用いてもよい。

このようにして得られたマイクロカプセルは、濾過して分取した後、ヘプタン等により繰り返し洗浄し、コアセルベーション剤を除去する。さらに、水中乾燥法と同様の方法で遊離薬物および溶媒の除去を行う。

洗浄中の粒子同士の凝集を防ぐために、洗浄液である蒸留水に凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトール、ブドウ糖、デンプン類（例、コーンスターチ等）などの水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等のタンパク質、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類などが挙げられる。

#### 【0029】

噴霧乾燥法によってマイクロカプセルを製造する場合には、上記の生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液を、ノズルを用いてスプレードライヤー（噴霧乾燥器）の乾燥室内へ噴霧し、極めて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒を揮発させ、微粒状のマイクロカプセルを調製する。該ノズルとしては、二流体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等が挙げられる。このとき、所望によって生理活性ペプチドと生体内分解性ポリマーとの有機溶媒溶液と同時にマイクロカプセルの凝集防止を目的として前述の凝集防止剤の水溶液を別ノズルより噴霧することも有効である。

このようにして得られたマイクロカプセルは、必要であれば加温・減圧下上述の条件でマイクロカプセル中の水分および有機溶媒の除去をさらに行う。

#### 【0030】

マイクロカプセルは、そのままあるいはマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化し、筋肉内、皮下、臓器などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤、経口剤〔例、カプセル剤（例、硬カプセル剤

、軟カプセル剤等)、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等] などとして投与することができる。

例えば、マイクロカプセルを注射剤とするには、マイクロカプセルを分散剤(例、Tween 80, HCO-60, カルボキシメチルセルロース, アルギン酸ナトリウムなど)、保存剤(例、メチルパラベン, プロピルパラベンなど)、等張化剤(例、塩化ナトリウム, マンニトール, ソルビトール, ブドウ糖など)などと共に水性懸濁剤とするか、ゴマ油, コーン油などの植物油と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。

マイクロカプセルの粒子径は、例えば懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば、粒子径として約0.1から500  $\mu\text{m}$  の範囲が挙げられる。好ましくは、約1から300  $\mu\text{m}$  の範囲の粒子径である。さらに好ましくは、約2から200  $\mu\text{m}$  の範囲の粒子径である。

マイクロカプセルを無菌製剤にするには、例えば製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

#### 【0031】

上記したマイクロカプセル以外にも、適当な方法で薬物を分散させた生体内分解型高分子組成物を溶解し、球状、棒状、針状、ペレット状、フィルム状等に賦形して本発明の徐放性製剤を製造することもできる。該生体内分解型高分子組成物は、例えば特公昭50-17525号公報に記載の方法にしたがって製造される。さらに具体的には、薬物および高分子重合物を溶媒に溶かし、溶媒を適当な方法(例、噴霧乾燥、フラッシュ蒸発等)によって除去することにより該生体内分解型高分子組成物を製造できる。

本発明の徐放性製剤は、筋肉内、皮下、臓器などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤、経口剤[例、カプセル剤(例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等)、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等] などとして投与することができる。

#### 【0032】

本発明の徐放性製剤は、低毒性で哺乳動物(例、ヒト、牛、豚、犬、ネコ、マ

ウス、ラット、ウサギ等) に対して安全に用いることができる。

徐放性製剤の投与量は、主薬である生理活性ペプチドの種類と含量、剤形、生理活性ペプチド放出の持続時間、対象疾病(例、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、思春期早発症、乳癌等のホルモン依存性の疾病および避妊など)、対象動物などによって種々異なるが、生理活性ペプチドの有効量であればよい。主薬である生理活性ペプチドの1回あたりの投与量としては、例えば徐放性製剤が1カ月製剤である場合、好ましくは、成人1人当たり約 0.01mg~100mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは、約 0.05mg~50mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。特に好ましくは、約 0.1mg~10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。

1回あたりの徐放性製剤の投与量は成人1人当たり好ましくは、約 0.1 mg~500 mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは、約 0.2 mg~300 mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、数週間に1回、1か月に1回、あるいは数か月に1回等、主薬である生理活性ペプチドの種類と含量、剤形、生理活性ペプチド放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって適宜選ぶことができる。

### 【0033】

#### 【実施例】

以下に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。以下の参考例および実施例中、%は特記しない限り重量%を示す。

以下に示すアミノ酸、保護基等に関し、略号で表示する場合、IUPAC-IUB コミッション・オン・バイオケミカル・ノーメンクレチャー (Commission on Biochemical Nomenclature) (ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry) 第138巻、9~37頁 (1984年)) による略号あるいは該当分野における慣用略号に基づくものとし、また、アミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

実施例中の下記略号は次のような意味を示す。

NAcD2NaI : N-アセチル-D-3- (2-ナフチル) アラニル  
 D4ClPhe : D-3- (4-クロロフェニル) アラニル  
 D3Pal : D-3- (3-ピリジル) アラニル  
 NMeTyr : N-メチルチロシル  
 DLys(Nic) : D- (イプシロン-N-ニコチノイル) リシル  
 Lys(Nisp) : (イプシロン-N-イソプロピル) リシル  
 DLys(AzaglyNic) : D- [1-アザ- (N-ニコチノイル) グリシル] リシル  
 DLys(AzaglyFur) : D- [1-アザ- (N-2-フロイル) グリシル] リシル  
 BOC : tert-ブトキシカルボニル  
 FMOC : 9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 Cbz : ベンジルオキシカルボニル

【0034】

参考例 1

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコに90%D,L-乳酸水溶液300gと90%L-乳酸水溶液100gを仕込み、窒素気流下100℃、500mmHgから150℃、30mmHgまで4時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、3~5mmHg、150~180℃で7時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のポリ乳酸を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、30℃で真空乾燥した。

得られたポリ乳酸のGPC測定による重量平均分子量は3,000であった。

参考例 2

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコに90%D,L-乳酸水溶液500gを仕込み、窒素気流下100℃、500mmHgから150℃、30mmHgまで4時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、3~5mmHg、150~180℃で12時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のポリ乳酸を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、30℃で真空乾燥した。

得られたポリ乳酸のGPC測定による重量平均分子量は5,000であった。



## 【0035】

## 参考例 3

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコに90%D,L-乳酸水溶液300gと90%L-乳酸水溶液100gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから150℃, 30mmHgまで5時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、5~7mmHg, 150~180℃で18時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のポリ乳酸を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、30℃で真空乾燥した。

得られた乳酸重合体のGPC測定による重量平均分子量は7,500であった。

## 参考例 4

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコに90%D,L-乳酸水溶液300gと90%L-乳酸水溶液100gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから150℃, 30mmHgまで5時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、5~7mmHg, 150~180℃で26時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のポリ乳酸を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、30℃で真空乾燥した。

得られたポリ乳酸のGPC測定による重量平均分子量は9,000であった。

## 【0036】

## 参考例 5

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコにグリコール酸182.5gとD,L-2-ヒドロキシ酪酸166.6gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから150℃, 30mmHgまで3.5時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、5~7mmHg, 150~180℃で26時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、25℃で真空乾燥した。

得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体のGPC測定による重量平均分子量は13,000であった。

## 参考例 6

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコにグリコール酸197.7gとD,L-2-ヒドロキシ酪酸145.8gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから155℃, 30mmHgまで4時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、3~6mmHg, 150~185℃で27時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、25℃で真空乾燥した。

得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体のGPC測定による重量平均分子量は13,000であった。

【0037】

#### 参考例 7

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコにグリコール酸212.9gとD,L-2-ヒドロキシ酪酸124.9gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから160℃, 30mmHgまで3.5時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、3~6mmHg, 160~180℃で27時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、25℃で真空乾燥した。

得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体のGPC測定による重量平均分子量は11,000であった。

【0038】

#### 参考例 8

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコに90%D,L-乳酸水溶液500gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから150℃, 30mmHgまで4時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、3~5mmHg, 150~180℃で10時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のポリ乳酸を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、30℃で真空乾燥した。

得られたポリ乳酸のGPC測定による重量平均分子量は4,200であった。

## 参考例 9

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4口フラスコにグリコール酸182.5gとD,L-2-ヒドロキシ酪酸166.6gを仕込み、窒素気流下100℃, 500mmHgから150℃, 30mmHgまで3.5時間かけて減圧加熱して留出水を除去した。さらに、5~7mmHg, 150~180℃で32時間減圧加熱した後冷却し、琥珀色のグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体を得た。

得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、25℃で真空乾燥した。

得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体のGPC測定による重量平均分子量は16,300であった。

【0039】

## 参考例 10

NACD2Nal-D4ClPhe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyFur)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub>の合成

参考例10および11は、米国特許第5110904号、米国特許出願番号第07/987,921号の記載に準じて行った。

ペプチド合成装置の反応容器内にD-Ala-NH-樹脂(4-メチル-ベンズヒドリルアミン樹脂)1gを入れた。ついでアミノ酸を以下の合成手順に従って順番に添加し、上記ペプチドの合成を行った。

## 1. 脱保護反応

ペプチドのアルファアミノ酸からBOC保護基を除去するために、45%トリフルオロ酢酸(以下、TFAと称することもある)、2.5%アニソール、2.0%ジメチルフォスファイトおよび50.5%ジクロロメタンからなる溶液を用いた。該溶液で樹脂を1分間予備洗浄後、脱保護反応を20分間行った。

## 2. 塩基性溶液による洗浄

脱保護に使用されるトリフルオロ酢酸を除去、中和するために、N,N'-ジイソプロピルエチルアミンを10%含有するジクロロメタン溶液を使用した。樹脂は、各脱保護反応ごとに1分間、3回洗浄した。

## 3. 結合反応

活性化剤としての3倍モル量の0.3M ジイソプロピルカルボジイミド/ジクロロメタン溶液と3倍モル量の0.3M BOCアミノ酸誘導体/DMF (N,N'-ジメチルホルムアミド) 溶液を用いて結合反応を行った。活性化されたアミノ酸は、樹脂上のペプチドの遊離アルファアミノ基に結合される。反応時間は下記に記した。

#### 4. 洗浄

各反応過程終了後には、ジクロロメタン、ジクロロメタン/DMF, DMFでそれぞれ1分間ずつ洗浄を行った。

【0040】

#### 合成プロトコール

アミノ基が保護されたアミノ酸は、以下の順番、結合回数、反応時間で樹脂に結合させた。

順番	アミノ酸	回数-時間
1	BOC-Pro	2回-1時間
2	BOC-Lys(N-イプシロン-Cbz, イソプロピル)	2回-1時間
3	BOC-Leu	2回-1時間
4	BOC-D-Lys(N-イプシロン-FMOC)	2回-1時間
5	BOC-NMeTyr(0-2,6-diCl-Bzl)	2回-1時間
6	BOC-Ser(0Bzl)	2回-1時間
7	BOC-D-3Pal	2回-6時間
8	BOC-D-4ClPhe	2回-2時間
9	BOC-D2Nal	2回-2時間
10	酢酸	2回-2時間

合成反応終了後の樹脂を30%濃度のピペリジンのDMF溶液で4~24時間処理し、FMOC保護基を除去した。得られる樹脂をジクロロメタンで数回洗浄後、DMF (18ml) に溶解したカルボニルジイミダゾール (0.9g) と15分間反応させ、ついでジクロロメタンで3回洗浄後、DMF (18ml) に溶解した2-フランカルボン酸ヒドラジド (2-furoic hydrazide) (0.53g) と1夜反応させた。得られるペプチド樹脂をジクロロメタンで3回洗浄後、五酸化リン共存下1夜

乾燥させ、ついでペプチドを樹脂から切断するためにアニソール存在下、0℃で1時間乾燥フッ化水素処理した。過剰の反応試薬は真空条件で除去した。得られる樹脂を最初エーテルで洗浄し、ついで50mlの水／アセトニトリル／酢酸(1:1:0.1)混液中室温で15分間攪拌後、濾過した。濾液を凍結乾燥することにより、綿毛状の粉末として未精製のペプチドを得た。該ペプチドを、以下の条件で高速液体カラムクロマトグラフィー(HPLC)を用いて精製した。

(1) カラム；ダイナマックスC-18(25X2.5cm, 8ミクロン)

(2) 溶媒；89%水／11%アセトニトリル／0.1%TFAからアセトニトリルを20分間にわたり上昇させるグラディエント法。

(3) 検出波長；260nm(UV法)

保持時間25.7分に単一ピークとして検出されたペプチドを分取後、凍結乾燥し、 $\text{NaCD}_2\text{NaI-D4ClPhe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyFur)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH}_2$ の精製品をトリフルオロ酢酸塩として得た。精製品の物性値は次のとおりであった。

FAB〔ファスト・アトム・ボンバードメント(Fast Atom Bombardment)、以下同意義を示す〕質量分析： $m/e\ 1591\ (M+H)^+$

アミノ酸分析値：0.98Ala, 1.02Pro, 1.58Lys, 1.00Leu, 1.12NMeTyr, 0.52Ser

上記したペプチドのトリフルオロ酢酸塩を、1規定濃度の酢酸で平衡化したゲル濾過カラムを用いて酢酸塩とした。ゲル濾過の条件を以下に示す。

(1) 充填剤；セファデックスG-25(カラムの内径：16mm, 充填剤の高さ：40mm)

(2) 溶媒；1規定酢酸

(3) 検出波長；254nm(UV法)

最初に溶出するピークの分画を集めて凍結乾燥し、 $\text{NaCD}_2\text{NaI-D4ClPhe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyFur)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH}_2$ の精製品を酢酸塩として得た。

【0041】

参考例11

NACD2NaI-D4C1Phe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyNic)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub>の合成

2-フランカルボン酸ヒドラジド (2-furoic hydrazide) を 2-ニコチン酸ヒドラジド (2-nicotinic hydrazide) (0.575g) とする以外は参考例10と同様にして上記ペプチドの合成を行った。得られる精製品のHPLCでの保持時間は、16.0分であった。また、精製品の物性値は次のとおりであった。

FAB質量分析:  $m/e$  1592 (M+H)<sup>+</sup>

アミノ酸分析値: 1.02Ala, 1.01Pro, 1.61Lys, 0.99Leu, 1.12NMeTyr, 0.48Ser

さらに参考例10と同様にして、上記したペプチドのトリフルオロ酢酸塩を、酢酸塩とした。

【0042】

#### 実施例1

NACD2NaI-D4C1Phe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(Nic)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub> (TAP社製、以下生理活性ペプチドAと略記する)の酢酸塩200mgを、参考例5で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例1で得られたポリ乳酸の等量混合物3.8gをジクロロメタン5.3g(4.0ml)に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め10℃に調節しておいた0.1% (w/w) ポリビニルアルコール (EG-40、日本合成化学製) 水溶液1000ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、7000 rpm で O/Wエマルジョンとした。このO/Wエマルジョンを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた後、遠心分離機 (05PR-22、日立製作所) を用いて 2000 rpm で捕集した。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行い、遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルは少量の蒸留水を加えて再分散した後、D-マンニトール0.3gを加え、この分散液を凍結乾燥して粉末として得られた。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチドAの含有率はそれぞれ 5~60 μm、4.7% (w/w) であった。

上記と同様にして、下記の(1)および(2)の生理活性ペプチドの製剤が製造される。

(1) NAcD2NaI-D4C1Phe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyNic)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub>

(2) NAcD2NaI-D4C1Phe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyFur)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub>

【0043】

## 実施例 2

生理活性ペプチド A の酢酸塩 200mgを、参考例 5 で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例 2 で得られたポリ乳酸の等量混合物3.8gをジクロロメタン 6.7 g(5.0 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め17℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液1000ml中に注入し、以下実施例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド A の含有率はそれぞれ 5~65 μm、5.0% (w/w) であった。

## 実施例 3

生理活性ペプチド A の酢酸塩 200mgを、参考例 5 で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例 3 で得られたポリ乳酸の等量混合物3.8gをジクロロメタン 6.7 g(5.0 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め17℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液1000ml中に注入し、以下実施例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド A の含有率はそれぞれ 10~60 μm、4.8% (w/w) であった。

【0044】

## 実施例 4

生理活性ペプチド A の酢酸塩 200mgを、参考例 5 で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例 4 で得られたポリ乳酸の等量混合物3.8gをジクロロメタン 6.7 g(5.0 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め17℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液1000ml中に注入し、以下実施例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド A の含有率はそれ

ぞれ 10~75  $\mu\text{m}$ 、4.6% (w/w) であった。

#### 実施例 5

生理活性ペプチド A の酢酸塩 200mgを、参考例6で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例2で得られたポリ乳酸の等量混合物3.8gをジクロロメタン 6.0 g(4.5 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め10℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液1000ml中に注入し、以下実施例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド A の含有率はそれぞれ 5~60  $\mu\text{m}$ 、4.9% (w/w) であった。

【0045】

#### 実施例 6

生理活性ペプチド A の酢酸塩 200mgを、参考例7で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例2で得られたポリ乳酸の等量混合物3.8gをジクロロメタン 6.0 g(4.5 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め17℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液1000ml中に注入し、以下実施例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド A の含有率はそれぞれ 10~65  $\mu\text{m}$ 、4.9% (w/w) であった。

【0046】

#### 実施例 7

生理活性ペプチド A の酢酸塩 400mgを、参考例9で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例8で得られたポリ乳酸の等量混合物3.6gをジクロロメタン 7.0 g(5.3 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を17℃に冷却した後、予め17℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液1000ml中に注入し、以下実施例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド A の含有率はそれぞれ 5~65  $\mu\text{m}$ 、7.2% (w/w) であった。

【0047】

#### 実施例 8



参考例11で得られたNAcD2Nal-D4ClPhe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyNic)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub> (以下生理活性ペプチド B と略記する) の酢酸塩 240 mgを、参考例9で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例8で得られたポリ乳酸の等量混合物1.76gをジクロロメタン 3.2 g(2.4 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を18℃に冷却した後、予め16℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液400ml中に注入し、以下実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド B の含有率はそれぞれ 5~70 μm、10.3% (w/w) であった。

#### 実施例 9

参考例10で得られたNAcD2Nal-D4ClPhe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(AzaglyFur)-Leu-Lys(Nisp)-Pro-DAlaNH<sub>2</sub> (以下生理活性ペプチド C と略記する) の酢酸塩 240 mgを、参考例9で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と参考例8で得られたポリ乳酸の等量混合物1.76gをジクロロメタン 3.2 g(2.4 ml) に溶解した液に加えて溶解した。この溶液を18℃に冷却した後、予め16℃に調節しておいた0.1%ポリビニルアルコール水溶液400ml中に注入し、以下実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中の生理活性ペプチド C の含有率はそれぞれ 5~65 μm、10.9% (w/w) であった。

【0048】

#### 実験例 1

実施例1で得られたマイクロカプセル約 30 mg を 0.5 ml の分散媒 (2.5 mg のカルボキシメチルセルロース、0.5 mg のポリソルベート 80、25 mg のマンニトールを溶解した蒸留水) に分散して10週齢雄性 SDラットの背部皮下に 22G 注射針で投与した (マイクロカプセルとしての投与量 60 mg/kg)。投与後一定時間毎にラットを屠殺して投与部位に残存するマイクロカプセルを取り出し、この取り出したマイクロカプセル中の生理活性ペプチド A を定量した結果を表1に示す。

## 【0049】

## 実験例2～6

実施例2～6で得られたマイクロカプセルを用い、実験例1と同様にして残存生理活性ペプチドAを定量した結果を表1に示す。

【表1】

生理活性ペプチドA 残存率 (%)								
	1日	1週	2週	3週	4週	5週	6週	8週
実験例1	88.0	66.5	42.3	15.2				
実験例2	92.8	76.6	62.6	48.7	38.6	26.5		
実験例3	96.5	90.5	77.5	64.9	59.2	46.9	38.7	20.3
実験例4	99.4	94.5	87.2	76.3	66.0	—	46.6	30.7
実験例5	92.9	75.0	45.7	—	17.5			
実験例6	92.3	61.3	33.5	6.4				

表1の結果に示されるように、本発明のグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体とポリ乳酸との混合ポリマーから成るマイクロカプセルではいずれも初期バーストが少なく、各期間にわたり生理活性ペプチドがほぼ一定に放出されている。

## 【0050】

表2には、表1の結果から生物検定法（佐久間 昭 著，東京大学出版会，1978年6月5日発行，111頁）に記載の方法に従って算出した直線回帰式、相関係数およびX切片として求まる放出期間を示す。

【表2】

ポリ乳酸の 重量平均分子量	直線回帰式	相関係数	放出期間
------------------	-------	------	------

実験例1	3000	残存率(%)=95.4-(26.9 X 週数)	( $R^2 = 0.992$ )	3.5週
実験例2	5000	残存率(%)=94.4-(14.2 X 週数)	( $R^2 = 0.975$ )	6.6週
実験例3	7500	残存率(%)=98.4-(10.0 X 週数)	( $R^2 = 0.996$ )	9.8週
実験例4	9000	残存率(%)=102.1-(8.9 X 週数)	( $R^2 = 0.995$ )	11.5週

表2の結果に示されるように、グリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体と混合するポリ乳酸の重量平均分子量を変化させることにより、放出期間を約3.5週間から約11.5週間までの各期間に調節することができる。

## 【0051】

表3には、表1の結果から表2と同様の方法に従って算出した直線回帰式、相関係数およびX切片として求まる放出期間を示す。

【表3】

グリコール酸共重合体中の グリコール酸のモル分率		直線回帰式	相関係数	放出期間
実験例2	60%	残存率(%)=94.4-(14.2 X 週数)	( $R^2 = 0.975$ )	6.6週
実験例5	65%	残存率(%)=95.7-(20.6 X 週数)	( $R^2 = 0.976$ )	4.6週
実験例6	70%	残存率(%)=96.6-(30.9 X 週数)	( $R^2 = 0.994$ )	3.1週

表3の結果に示されるように、ポリ乳酸と混合するグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体中のグリコール酸の割合を変化させることにより、放出期間を約3.1週間から約6.6週間までの各期間に調節することができる。

## 【0052】

## 実験例7～9

実施例7～9で得られたマイクロカプセルを用い、マイクロカプセルとしての投与量が約30 mg/kgと異なる以外実験例1と同様にして、残存生理活性ペプチドを定量した結果を表4に示す。さらに、表4の結果から表2と同様にして算出

した直線回帰式、相関係数および X 切片として求まる放出期間を表 5 に示す。

【表 4】

		生理活性ペプチド残存率 (%)					
		生理活性ペプチド	1日	1週	2週	3週	4週
実験例7	A		99.3	74.5	51.4	33.2	24.1
実験例8	B		87.4	75.0	52.3	32.8	25.1
実験例9	C		89.4	73.6	54.9	37.7	23.4

【表 5】

生理活性ペプチド		直線回帰式	相関係数	放出期間
実験例7	A	残存率(%)=97.8-(20.1 X 週数)	(R <sup>2</sup> = 0.975)	4.9週
実験例8	B	残存率(%)=93.5-(18.6 X 週数)	(R <sup>2</sup> = 0.971)	5.0週
実験例9	C	残存率(%)=94.4-(18.5 X 週数)	(R <sup>2</sup> = 0.987)	4.9週

表 4 および表 5 の結果に示されるように、本発明のグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体とポリ乳酸の混合ポリマーから成るマイクロカプセルでは、いずれも生理活性ペプチドの初期バーストが少なく、各期間にわたり生理活性ペプチドがほぼ一定に放出されている。

【0053】

## 【発明の効果】

本発明の徐放性製剤は長期間にわたって定常的な薬物の放出を示し、持続的で安定な効果が得られる。しかも、薬物の放出期間を容易に制御でき、投与直後における過剰量の薬物放出を抑制し得る。また、安定かつ低毒性で、安全に投与できる。

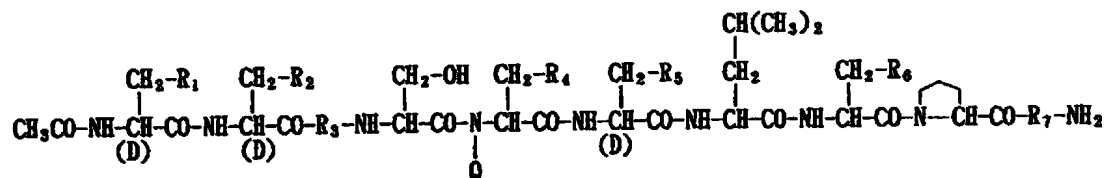
本発明の製造法によれば、水に難溶性の生理活性ペプチドを含有する徐放性製剤が、容易にかつ収率よく得られる。

【化 1】



(式中、Rは炭素数2から8のアルキル基を表す)で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体および(B)ポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーと一般式

【化 2】



〔式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_4$ は芳香環基を、 $R_3$ はD-アミノ酸残基等を、 $R_5$ は芳香環基等を、 $R_6$ は式 $-(CH_2)_n-R_6'$ （式中、 $n=2$ 等を、 $R_6'$ は置換されていてもよいアミノ基を示す）で表される基を、 $R_7$ はD-アミノ酸残基等を、 $Q$ は水素原子等を示す〕で表される生理活性ペプチドまたはその塩からなる徐放性製剤および水に難溶性の生理活性ペプチドを含有する徐放性製剤の製造方法。

【効果】本発明の徐放性製剤は、長期間にわたって定常的な薬物の放出を示し、また、薬物の放出期間を容易に制御できる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089543

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 岩田 弘

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
氏 名 武田薬品工業株式会社